



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Off nl gungsschrift**
⑩ **DE 101 63 098 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
C 12 N 7/01

36

②1 Aktenzeichen: 101 63 098.0
②2 Anmeldetag: 20. 12. 2001
④3 Offenlegungstag: 30. 4. 2003

DE 101 63 098 A 1

⑥6 Innere Priorität:
101 50 187. 0 12. 10. 2001
⑦1 Anmelder:
Ribopharma AG, 95447 Bayreuth, DE
⑦4 Vertreter:
Gassner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen

⑦2 Erfinder:
John, Matthias, Dr., 96103 Hallstadt, DE; Limmer,
Stefan, Dr., 95512 Neudrossenfeld, DE; Vornlocher,
Hans-Peter, Dr., 95448 Bayreuth, DE; Kreutzer,
Roland, Dr., 95466 Weidenberg, DE
⑤6 Entgegenhaltungen:
Nature 391, S. 806-811, 1998;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren
⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende (3'-UTR) des Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region. Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, daß eine Struktur innerhalb der 3'-UTR derart geändert wird, daß eine Replikation des Virus-Genoms gehemmt oder blockiert wird.

DE 101 63 098 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament zur Hemmung der Replikation von Viren nach dem Oberbegriff der Ansprüche 1, 14 und 26.

5 [0002] Die Erfindung betrifft insbesondere das Gebiet der Hemmung von (+)-Strang-RNA-Viren, wie Hepatitis-C-Viren.

[0003] Das Genom von (+)-Strang-RNA-Viren ist ein einzelsträngiges kodierendes RNA-Molekül (+ssRNA). Zu diesen Viren gehören die Familien Picornaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Coronaviridae und Caliciviridae. Ein bedeutender Vertreter der Familie Flaviviridae ist das Hepatitis-C-Virus (HCV). Es verursacht Hepatitis C, eine entzündliche Erkrankung der Leber, die mit Leberfibrose und Leberkrebs verbunden sein kann. Ein erheblicher Teil der Hepatitis-C-Erkrankungen verläuft chronisch. Die Infektion mit HCV erfolgt vor allem parenteral, beispielsweise durch Bluttransfusion oder durch Gabe von Medikamenten aus Blutprodukten.

[0004] Das Hepatitis-C-Virus wurde 1989 entdeckt (Choo et al., Science 244: 359, 1989). Die Replikation des codierenden (+)-Strangs wird durch die Erzeugung eines replikativen antisense bzw. (-)-Strangs vermittelt. Vom (-)-Strang werden mehrere Kopien des codierenden (+)-Strangs abgeschrieben. Das HCV-Genom, welches ca. 9600 Nukleotide umfaßt, wird zu einem Polyprotein mit ca. 3000 Aminosäuren translatiert (Leinbach et al., Virology, 204: 163, 1994). Virale und zelluläre Proteasen schneiden aus diesem Polyprotein die funktionsfähigen Viruseiweiße heraus. Sowohl am 5'-Ende, als auch am 3'-Ende des HCV-Genoms, befinden sich hochkonservierte Sequenzen, welche ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden. Diese Sequenzen besitzen für die Translation und die Replikation der HCV-Viren eine große Bedeutung, werden aber bei der Eiweißsynthese nicht translatiert. Diese Sequenzen werden als 5'UTR und 3'UTR bezeichnet (UTR = untranslated region).

[0005] HCV ist durch eine hohe genetische Variabilität gekennzeichnet. Die hohe Mutationsrate der viralen Nukleinsäure hat zur Entwicklung mehrerer HCV-Genotypen geführt, die eine vergleichsweise geringe Sequenzidentität von etwa 70% aufweisen (Simmonds et al., J. Gen. Virol., 75: 1053, 1994). Die Häufigkeit der einzelnen Genotypen ist regional unterschiedlich. Darüber hinaus besteht eine Abhängigkeit von der Art der Übertragung, wobei eine gleichzeitige Ansteckung mit verschiedenen HVC-Genomen möglich ist. Die hohe Variabilität des HCV erschwert die Behandlung von Erkrankungen erheblich.

[0006] Eine Hepatitis-C-Erkrankung umfaßt in der Regel mehrere Phasen. Die erste akute Phase beginnt mit der Ansteckung des Patienten mit HCV. Es wird ein Entzündungsvorgang ausgelöst, der durch einen etwa vier Wochen nach der Ansteckung beginnenden Anstieg der Leberenzymkonzentration im Blutserum gekennzeichnet ist. Vor dem Anstieg der Leberenzymkonzentration ist es möglich, im Blutserum des Patienten HCV-RNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nachzuweisen. In diesem Stadium zeigen nur etwa 25% der Patienten Symptome wie Gelbsucht, so daß bei 75% die Infektion unerkannt bleibt. Auch wenn die akute HCV-Infektion eine nicht-maligne Erkrankung ist, führt die Infektion in etwa 80% zu einer chronischen Lebererkrankung, die durch einen dauerhaften Anstieg des Alaninaminotransferase-Niveaus im Serum gekennzeichnet ist. Aus einer chronischen HCV-Erkrankung entwickelt sich bei mehr als 20% der Patienten eine Leberzirrhose und bei einer nicht unerheblichen Zahl ein malignes Hepatom. Die Lebenserwartung nach der Diagnose eines malignen Hepatoms beträgt in der Regel zwölf Monate.

[0007] Bisher bekannte therapeutische Verfahren zur Behandlung von HCV-Infektionen haben nur einen begrenzten Erfolg gehabt und führten bei der Mehrzahl der Patienten zu keiner anhaltenden Besserung. Die heute vorherrschende Therapieform verwendet spezielle Zytokine, die als Interferone bezeichnet werden. Vorzugsweise wird Interferon- α (IFN- α) eingesetzt, das nach sechsmonatiger Therapie bei etwa 50% der Patienten zu einer Verringerung der Alaninaminotransferase-Werte im Serum führt. Allerdings steigen diese Werte bei vielen Patienten nach dem Ende der Behandlung wieder an. Überdies ist die Behandlung mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden (Dushenko et al. J. Viral Hepatitis, 1: 3, 1994). Trotzdem ist die Interferon-Therapie bisher das wichtigste Verfahren, um das Risiko der Entstehung von Leberzirrhose und eines malignen Hepatoms zu verringern. Ein Impfschutz gegen HCV ist bisher nicht möglich.

[0008] Es sind deshalb Versuche unternommen worden, die virale Proteintranslation unter Einsatz spezieller Ribozyme zu hemmen. Beispielsweise beschreiben Welch et al. (Gene Therapy, 3 (11): 994, 1996) zwei vektorexprimierte Hairpin-Ribozyme, die gegen HCV gerichtet sind. Lieber et al. (Virology, 70 (12): 8782, 1996) beschreiben die Beseitigung von HCV-BNA in infizierten menschlichen Hepatozyten durch Adenovirus-vermittelte Expression von bestimmten Hammerhead-Ribozymen. WO 99/55847 offenbart Ribozyme, die HCV-RNA-Spezies schneiden können.

[0009] Auch das US-Patent Nr. 5,610,054 offenbart enzymatische Nukleinsäuremoleküle, welche die Replikation von HCV inhibieren können. Die vorgeschlagenen Verfahren unter Einsatz autokatalytischer Ribozyme hemmen die Virusreplikation in der Regel durch Angriffe im Bereich der 5'-nicht-translatierten Regionen.

55 [0010] Der therapeutische Erfolg dieser Verfahren bei der Behandlung von HCV-Infektionen ist jedoch noch nicht erwiesen. Ein generelles Problem besteht darin, daß die enzymatische Aktivität von Ribozymen vergleichsweise gering ist. Es besteht ein Bedürfnis, weitere Verfahren zur effizienten Behandlung von HVC-Infektionen bzw. Virusinfektionen zu entwickeln.

[0011] Aus Fire et. al (Nature, 391: 806, 1998) ist es bekannt, daß dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, daß die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA oder mit dsRNA assoziierten Enzyme zurückzuführen ist. Dieses Verfahren wird als RNA-Interferenz bezeichnet und wird beispielsweise in WO 00/44895 zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens verwendet.

65 [0012] Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein Verfahren und eine Verwendung angegeben werden, welche die Replikation von Viren wirksam hemmen. Darüber hinaus soll ein Medikament angegeben werden, mit dem eine besonders wirksame Hemmung der Replikation von Viren bewirkbar ist.

[0013] Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 14 und 26 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 13, 15 bis 25 und 27 bis 38.

[0014] Nach Maßgabe der Erfindung ist verfahrensseitig vorgesehen, daß eine Struktur innerhalb der 3'-UTR derart geändert wird, daß eine Replikation des Virus-Genoms gehemmt oder blockiert wird.

[0015] Unter dem Begriff "Struktur" wird hier die Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur einer aus Nukleinsäure gebildeten Sequenz verstanden. Eine Änderung der Struktur liegt z. B. vor, wenn die Primärsequenz geschnitten oder durch Deletionen oder Insertionen verändert wird. Eine Änderung kann auch die Sekundärstruktur, d. h. die Basenpaarung, betreffen. Schließlich ist auch eine Änderung der räumlichen Struktur, d. h. der Tertiärstruktur, möglich.

[0016] Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß durch eine Änderung der Struktur innerhalb der 3'-UTR die Replikation des Virus-Genoms gehemmt oder blockiert werden kann. Damit ist es möglich, Hepatitis-C-Viren besonders effizient zu bekämpfen.

[0017] Nach einer Ausgestaltung kann ein die 3'-UTR bildender Sequenzabschnitt geschnitten werden. Die 3'-UTR kann hochkonserviert sein. Die Änderung der Struktur wird zweckmäßigerweise in einem besonders hoch konservierten Bereich der 3'-UTR bewirkt. Das steigert weiter die Effizienz des Verfahrens.

[0018] Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, den Sequenzabschnitt unter Verwendung einer kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zu ändern, insbesondere zu schneiden. Dabei muß der eine Strang der dsRNA abschnittsweise komplementär zur 3'-UTR Sequenz sein.

[0019] Nach einer weiteren Ausgestaltung kann die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet sein. Zumindest ein Strang kann am 3'-Ende einen Überhang haben, der aus 1 bis 3 Nukleotiden bestehen kann. Die vorerwähnten Merkmale beeinflussen die Plasmastabilität der dsRNA. dsRNA mit glatten Enden weist eine höhere Plasmastabilität als dsRNA mit Überhängen auf. Die Plasmastabilität kann also durch die jeweilige Konstruktion der dsRNA an die jeweiligen Erfordernisse angepaßt werden.

[0020] Weiterhin hat es sich als vorteilhaft erwiesen, daß der komplementäre Bereich weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 19 bis 24, Basenpaare umfaßt. Die dsRNA weist zweckmäßigerweise eine Länge von weniger als 30, weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare auf. Damit entspricht die Länge der dsRNA im wesentlichen der Länge des komplementären Bereichs. Eine solche dsRNA kann besonders preisgünstig hergestellt werden.

[0021] Zweckmäßigerweise ist das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus, insbesondere eines Hepatitis-C-Virus.

[0022] Erfindungsgemäß ist weiter die Verwendung von kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren zur Änderung der Struktur innerhalb einer am 3'-Ende eines Virus-Genoms befindlichen nicht translatierten Region vorgesehen, so daß eine Replikation des Virus-Genoms gehemmt wird. Zur Lösung der Aufgabe wird ferner ein Medikament vorgeschlagen, bei dem ein Mittel zur Änderung der Struktur der 3'-UTR enthalten ist.

[0023] Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen der Verwendung und des Medikaments wird auf die zum Verfahren beschriebenen Merkmale verwiesen, welche sinngemäß auch hier Anwendung finden können.

[0024] Nachfolgend wird anhand der Figuren ein Ausführungsbeispiel der Erfindung näher erläutert. Es zeigen:

[0025] Fig. 1 den relevanten Sequenzbereich aus Plasmid p2 und die N-terminale Aminosäuresequenz des entsprechenden Reporterproteins,

[0026] Fig. 2 den relevanten Sequenzbereich aus Plasmid p3 und die N-terminale Aminosäuresequenz des entsprechenden Reporterproteins,

[0027] Fig. 3 die dsRNA HCV1-2 gegen die HCV-Sequenz der mRNA aus Plasmid p2 und p3,

[0028] Fig. 4 die dsRNA GAL1-2 gegen eine mRNA-Sequenz aus dem β -Gal-Gens (Positivkontrolle),

[0029] Fig. 5 die dsRNA HCV3-4 gegen eine mRNA-Sequenz ohne Bezug zu exprimierten Genen (Negativkontrolle),

[0030] Fig. 6 die β -Galaktosidase-Aktivität bei Anwendung der dsRNA HCV1-2, GAL1-2 und HCV3-4 in Abhängigkeit von der dsRNA Konzentration für Plasmid p2,

[0031] Fig. 7 die β -Galaktosidase-Aktivität bei Anwendung der dsRNA HCV1-2, GAL1-2 und HCV3-4 in Abhängigkeit von der dsRNA Konzentration für Plasmid p3.

Ausführungsbeispiel

[0032] Molekularbiologische Analysen mit Hepatitis-C-Viren in Zellkultur sind sehr schwierig. Der Effekt der RNA-Interferenz auf virale Gensequenzen wird an Hand nicht-pathogener Ersatzsysteme untersucht. Als nicht-pathogenes Reportersystem zum Studium der RNA-Interferenz wurden kurze, 24 Nukleotide umfassende Sequenzen aus dem HCV-Genom (hochkonservierter Bereich des 3'UTR) als Teil einer mRNA der β -Galaktosidase in Leberzellen exprimiert. Diese 24 Nukleotide wurden als Zielsequenz gemäß Sequenzprotokoll Nr. 1 verwendet.

Herstellung von Plasmid p2 als Reporter-gen

[0033] Als nicht-pathogenes Reportersystem zum Nachweis der RNA-Interferenz mit der Zielsequenz wurden Fusionsgene hergestellt. Als Basis dieser Fusionsgene dienten codierende Sequenzen der β -Galaktosidase (β -Gal) aus E. coli. Das β -Gal-Gen stammt aus dem kommerziell erhältlichen Expressionsvektor p β -Gal-Control (Clontech, Gene Accession Number U13186; Nukleotid 280–3429). Dem β -Gal-Gen wurde die virale Sequenz von HCV als Bestandteil der mRNA am 5'-Ende vorangestellt.

[0034] In Plasmid p2 (Sequenzprotokoll Nr. 2) ist die HCV-Sequenz Teil eines Fusionsgens, das als Fusionsprotein exprimiert wird. Die HCV-Sequenz ist Teil des offenen Leserahmens von β -Galaktosidase. Fig. 1 zeigt den relevanten Sequenzabschnitt von Plasmid p2. Die HCV-Sequenz ist kursiv dargestellt. Der Beginn des β -Gal-Gens (einschließlich 6 Nukleotide der Kozak-Sequenz vor dem Codon ATG) ist unterstrichen. Die N-terminale Aminosäuresequenz des Fusionsproteins HCV- β -Galaktosidase ist unter der DNA-Sequenz aufgeführt.

[0035] In Plasmid p3 (Sequenzprotokoll Nr. 3) ist die HCV-Sequenz Teil eines Fusionsgens, das aber nicht als Fusionsprotein exprimiert wird. Die HCV-Sequenz befindet sich außerhalb des offenen Leserahmens von β -Galaktosidase. Fig. 2 zeigt den relevanten Sequenzabschnitt von Plasmid p3. Die HCV-Sequenz ist kursiv dargestellt. Der Beginn des β -Gal-Gens (einschließlich 6 Nukleotide der Kozak-Sequenz vor dem Startcodon ATG) ist unterstrichen. Die N-terminale Aminosäuresequenz des β -Galaktosidase Proteins ist unter der DNA-Sequenz aufgeführt.

[0036] Die so generierten Fusionsgene wurden in das kommerziell erhältliche Expressionsplasmid pcDNA3.1 (+) kloniert (Invitrogen, Gene Accession Number nicht erhältlich, Katalognummer V790-20).

[0037] Als Kontrollplasmid für die Transfektionseffizienz wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pGL3-ctrl (Promega, Gene Accession Number U47296) verwendet. Es codiert und exprimiert das Gen der "Firefly Luciferase".

Verwendete dsRNA-Oligonukleotide

[0038] Zur Durchführung der RNA-Interferenz wurden drei kurze, doppelsträngige Ribonukleinsäuren (dsRNA) verwendet. Diese dsRNAs bestehen aus jeweils 2 kurzen Oligonukleotiden, welche über fast den gesamten Sequenzbereich zueinander komplementär sind. An beiden 3'-Enden der Oligonukleotide besitzen zwei Nukleotide keine Partner und bilden deshalb in der dsRNA Überhänge.

[0039] Die Sequenz des einen Oligonukleotids ist identisch mit der Zielsequenz der mRNA. Dieses Oligonukleotid wird deshalb als Sinn-Strang bezeichnet. Die Sequenz des anderen Oligonukleotids ist zu der Zielsequenz der mRNA komplementär. Dieses Oligonukleotid wird deshalb als Antisinn-Strang bezeichnet.

[0040] In Fig. 3 ist das als HCV1-2 bezeichnete Oligonukleotid gegen die HCV-Sequenz der mRNA von Plasmid p2 und Plasmid p3 dargestellt, wobei die mit Großbuchstaben dargestellten Nukleotide der HCV-Sequenz in Plasmid p2 bis p3 entsprechen. HCV1-2 besteht aus dem Sinn-Strang HCV 1 und dem Antisinn-Strang HCV 2, wobei jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden der Stränge keinen Partner aufweisen. Der in Sequenzprotokoll Nr. 3 dargestellte Sinn-Strang (HCV 1), weist nahezu dieselbe Nukleotidsequenz wie die HCV-Sequenz des Plasmids p2 bzw. p3 auf. Am 5'-Ende fehlen drei Nukleotide der HCV-Sequenz und am 3'-Ende befinden sich zwei Nukleotide, die nicht Bestandteil der HCV-Sequenz sind. Der in Sequenzprotokoll Nr. 4 dargestellte Antisinn-Strang (HCV 2) ist abgesehen von den jeweils zwei Nukleotiden am 5'- und 3'-Ende komplementär zu HCV 1 und damit auch zu der HCV-Sequenz in Plasmid p2 bzw. p3, die einer 3'-nicht-translatorischen Region des HCV-Genoms entspricht.

[0041] Zur positiven Kontrolle wurde ein als GAL1-2 bezeichnete dsRNA verwendet, die in Fig. 4 gegen eine mRNA-Sequenz aus dem 13-Gal-Gen (in Fig. 4 als mRNA bezeichnet) dargestellt ist. GAL1-2 besteht aus dem Sinn-Strang GAL 1 und dem Antisinn-Strang GAL 2, wobei jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden der Stränge keinen Partner aufweisen. Der in Sequenzprotokoll Nr. 5 dargestellte Sinn-Strang (GAL 1) weist nahezu dieselbe Nukleotidsequenz wie eine mRNA-Sequenz aus dem β -Gal-Gen auf. Der in Sequenzprotokoll Nr. 6 dargestellte Antisinn-Strang (GAL 2) ist abgesehen von den jeweils zwei Nukleotiden am 5'- und 3'-Ende komplementär zu GAL 1 und damit auch zu der mRNA-Sequenz aus dem β -Gal-Gen.

[0042] Zur negativen Kontrolle wurde eine als HCV3-4 bezeichnete dsRNA verwendet, die keinen Bezug zu exprimierten Genen hat (Fig. 5). HCV3-4 besteht aus dem Sinn-Strang HCV 3 und dem Antisinn-Strang HCV 4, wobei jeweils zwei Nukleotide an den 3'-Enden der Stränge keinen Partner aufweisen. Der in Sequenzprotokoll Nr. 7 dargestellte Sinn-Strang (HCV 3) weist nahezu keine Ähnlichkeit zur mRNA-Sequenz aus p2 oder p3 auf und ist deshalb ohne Bezug zu den exprimierten Genen (in Fig. 5 als mRNA bezeichnet) auf. Der in Sequenzprotokoll Nr. 8 dargestellte Antisinn-Strang (HCV 4) ist abgesehen von den jeweils zwei Nukleotiden am 5'- und 3'-Ende komplementär zu HCV 3 und ist deshalb ohne Bezug zur mRNA-Sequenz.

Herstellung des Zellkulturmediums

[0043] Für den Nachweis der RNA Interferenz wurden Experimente mit Leberzelllinien des Typs HuH-7 durchgeführt (Nakabayashi et al. 1982). Diese Zelllinie kann durch HCV infiziert werden und diente zur Kultivierung dieser Viren. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert.

Transfektion

[0044] Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden 2×10^4 Zellen pro 96-well Kuhle ausgesät. 3 μ g Plasmid p2 bzw. Plasmid p3 wurden mit 1 μ g Kontrollplasmid pGL3-ctrl. gemischt. Es wurden 0,25 μ g dieser Plasmidgemische pro 96-well Kuhle transfiziert. Etwa 24 Stunden nach dem Aussähen der Zellen wurden die Reporterplasmide p2/pGL3-ctrl und p3/pGL3-ctrl zusammen mit dsRNA in HuH-7 transfiziert. Die Dichte an transfizierter DNA pro Kuhle war konstant.

[0045] Die Menge an dsRNA wurde in abnehmenden Konzentrationen von 400 nM bis 12,5 nM (in Bezug auf 110 μ l Transfektionsvolumen) zu den Plasmidgemischen zugegeben. Die Ausgangskonzentration der dsRNA HCV1-2, GAL1-2 und des unspezifischen HCV3-4 in der jeweiligen Stammlösung betrug jeweils 20 μ M. Die dsRNA wurden durch Mischen mit gleichen Volumina Annealing buffer (AB, 100 mM NaCl, 20 mM Na-Phosphat, pH 6,8) stufenweise auf die Endkonzentration verdünnt.

[0046] Für eine Endkonzentration von 400 nM wurden bei einer Stammkonzentration an dsRNA von 20 μ M 2,2 μ l Stammlösung auf 110 μ l Transfektionsvolumen pro 1 Well bzw. 6,6 μ l Stammlösung auf 330 μ l Transfektionsvolumen pro 1 Well verwendet. Die Verdünnungsstufen wurden gemäß Tabelle 1 hergestellt.

Tabelle 1

Herstellung von Verdünnungsstufen der dsRNA

Lösung-Nr.	Ausgangslösung	Konzentration der Ausgangslösung (μM)	Menge der Ausgangslösung (μl)	Menge an zuge-setztem AB (μl)	Endkonzentration* (nM)
1	Stammlösung	20	14,0	-	400
2	Lösung 1	10	7,0	7,0	200
3	Lösung 2	5	7,0	7,0	100
4	Lösung 3	2,5	7,0	7,0	50
5	Lösung 4	1,25	7,0	7,0	25
6	Lösung 5	0,62	7,0	7,0	12,5

* Endkonzentration unter Verwendung von 6,6 μl der jeweiligen

Lösung auf 300 μl Transfektionsvolumen

[0047] Plasmide und dsRNA wurden co-transfiziert. Als Transfektionsagens wurde Gene Porter 2 (PeQLab, Katalognummer 13-1202007) eingesetzt. Jede Co-Transfektion wurde dreifach durchgeführt.

[0048] Für drei Kulturen in 96-well-Platten wurde ein Gemisch aus 2,0 μl eines Plasmidgemisches aus Plasmid p2 und Kontrollplasmid pGL3 (0,3875 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 3 : 1), 6,6 μl dsRNA (20, 10, 5, 2,5, 12,5 bzw. 0,62 μM) und 16,4 μl DNA-Diluent B hergestellt. Dieses Gemisch wurde mit einem Gemisch aus 6,0 μl Gene Porter 2 und 19 μl Serum-freiem Medium vermischt. Das Gesamtvolumen des so erhaltenen Gemisches betrug 50 μl , von denen 16,5 μl zu jeweils 2×10^4 HuH-7 in 100 μl Medium gegeben wurden.

[0049] Weiterhin wurde ein Gemisch aus 2,0 μl eines Plasmidgemisches aus Plasmid p3 und Kontrollplasmid pGL3 (0,3875 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 3 : 1), 6,6 μl dsRNA (20, 10, 5, 2,5, 12,5 bzw. 0,62 μM) und 16,4 μl DNA-Diluent B hergestellt. Dieses Gemisch wurde mit einem Gemisch aus 6,0 μl Gene Porter 2 und 19 μl Serum-freiem Medium vermischt. Das Gesamtvolumen des so erhaltenen Gemisches betrug 50 μl , von denen 16,5 μl zu jeweils 2×10^4 HuH-7 in 100 μl Medium gegeben wurden.

[0050] Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Einen Tag nach der Transfektion wurden 35 μl frisches Medium pro Kuhle zugegeben und die Zellen weitere 24 h inkubiert. Dann erfolgte der Aufschluß der Zellen.

Verwendete Nachweismethoden

[0051] Der Effekt der dsRNA auf die Expression der Reportergene wurde durch Quantifizierung der β -Galaktosidase und Luciferase mit Chemolumineszenz bestimmt. Dazu wurden Lysate gemäß den Herstellervorschriften hergestellt.

[0052] Zum Nachweis der β -Galaktosidase wurden 2 μl Lysat pro Analyse sowie das Substrat Galcto-Star (Tropix, Katalognummer BM100S) verwendet. Zum Nachweis der Luciferase wurden 5 μl Lysat pro Analyse sowie das Substrat Luciferin (Tropix, Katalognummer BC100L) verwendet. In beiden Fällen stammte das verwendete Luminometer von Berthold Sirius.

Ergebnisse

[0053] Pro Transfektionsansatz wurden 3×96 -well-Kulturen ausgewertet, wobei jeweils eine Messung für β -Galaktosidase und eine Messung für Luciferase erfolgte. Der Quotient aus relativen Lichteinheiten (RLU) für β -Galaktosidase und den relativen Lichteinheiten für Luciferase wurde berechnet. Für diese drei Einzelwerte wurde ein Mittelwert ermittelt. Der Mittelwert für p2/pGL3- bzw. p3/pGL3-transfizierte Zellen ohne dsRNA wurde willkürlich als 1,0 definiert. Die unter dsRNA-Einfluß veränderten Werte werden im Verhältnis zu 1,0 aufgetragen (siehe Fig. 6 und 7), d. h. ein Wert von 0,6 entspricht einer Hemmung der β -Galaktosidase-Aktivität um 40% im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

[0054] Aus Fig. 6 ist zu erkennen, daß bei einer Co-Transfektion von sequenzspezifischen dsRNA mit Plasmid p2 eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgt. Die dsRNA HCV1-2 und GAL1-2 hemmen die β -Galaktosidase mit vergleichbarer Effizienz. Bei 400 nM und 200 nM dsRNA im Transfektionsvolumen sinkt die Aktivität der β -Galaktosidase auf 40% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Mit abnehmender Konzentration der dsRNA läßt der hemmende Effekt nach. Die Kontroll dsRNA HCV3-4 führt über den gesamten Konzentrationsbereich zu keiner Abnahme an β -Galaktosidase im Lysat.

[0055] Bei einer Co-Transfektion von sequenzspezifischen dsRNA HCV1-2 mit Plasmid p3 ist ebenfalls eine Reduktion der β -Galaktosidase Expression nachweisbar (Fig. 7). Die dsRNA HCV1-2 und GAL1-2 hemmen β -Galaktosidase mit vergleichbarer Effizienz. Bei 400 nM und 200 nM dsRNA im Transfektionsvolumen sinkt die Aktivität der β -Galaktosidase auf etwa 20% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Mit abnehmender Konzentration der dsRNA läßt der hemmende Effekt nach. Das Kontrolloligonukleotid HCV3-4 zeigt über den gesamten Konzentrationsbereich eine schwache Hemmung der β -Galaktosidase auf etwa 70% im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

[0056] In Gegenwart von dsRNA HCV1-2 war somit sowohl für Plasmid p2 als auch Plasmid p3 eine deutliche Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität erkennbar. Vergleichbare Effekte zeigte dsRNA GAL1-2 (positive Kontrolle). Die zweite Kontroll dsRNA HCV3-4 führte zu keiner bzw. einer deutlich geringeren Hemmung der β -Galaktosidase-Aktivität.

[0057] Die Expression und/oder die Stabilität der RNA konnte im beschriebenen Experiment durch dsRNA stark gemindert werden. Dies gelang auch für HCV-Zielsequenzen außerhalb des offenen Leserahmens, welches der Situation für den natürlichen 3'-UTR Bereich von HCV entspricht.

DE 101 63 098 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110>	John Dr., Matthias	5
<120>	Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren	
<130>		10
<140>		
<141>		15
<160>	8	
<170>	PatentIn Ver. 2.1	20
<210>	1	25
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Künstliche Sequenz	30
<220>		
<223>	Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA, die einer Sequenz des HCV-Genoms gleicht	35
<400>	1	40
	gtcacggct agctgtgaaa ggtcc	24
<210>	2	45
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	Künstliche Sequenz	50
<220>		
<223>	Beschreibung der künstlichen Sequenz: Fusionsgen	55
<400>	2	60
	GTCACCATGT CGTCACGGCT AGCTGTGAAA GGTCAGTCA CCATGTCGTT TACTTTG	57
		65

<210> 3
 <211> 57
 5 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 10 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Fusionsgen

 15 <400> 3
 GTCACCTTGT CGTCACGGCT AGCTGTGAAA GGTCCAGTCA CCATGTCGTT TACTTTG 57
 20

 <210> 3
 25 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

 30 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Sinn-Strang eines dsRNAi-Oligonukleotids
 35
 <400> 3
 40 ACGGCUAGCU GUGAAAGGUC CGU 23

 <210> 4
 45 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz
 50
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 55 Antisinn-Strang eines dsRNAi-Oligonukleotids

 <400> 4
 60

 65

GGACCUUUA CAGCUAGCCG UGA

23

5

<210> 5

<211> 23

<212> RNA

10

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sinn-Strang eines dsRNAi-Oligonukleotids

20

<400> 5

GUGAAAUUAU CGAUGAGCGU GGU

23

25

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

30

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Antisinn-Strang eines dsRNAi-Oligonukleotids

40

<400> 6

CACGCUCAUC GAUAAUUUCA CCG

23

45

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

50

<213> Künstliche Sequenz

55

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Sinn-Strang eines dsRNAi-Oligonukleotids

60

65

<400> 7

AGACAGUCGA CUUCAGCCUG G

21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Antisinn-Strang eines dsRNAi-Oligonukleotids

<400> 8

AGGCUGAAGU CGACUGUCUG G

21

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende (3'-UTR) des Virus-Genoms befindlichen nichttranslatierten Region, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Struktur innerhalb der 3'-UTR derart geändert wird, daß eine Replikation des Virus-Genoms gehemmt oder blockiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein die 3'-UTR bildender Sequenzabschnitt geschnitten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die 3'-UTR hochkonserviert ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Sequenzabschnitt unter Verwendung einer kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) geändert, insbesondere geschnitten wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang der dsRNA abschnittsweise oder vollständigkomplementär zur 3'-UTR Sequenz der Viren ist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Strang, vorzugsweise beide Stränge, am 3'-Ende einen Überhang haben.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet ist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfaßt.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus ist.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis-C-Virus ist.
14. Verwendung von kurzen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (dsRNA) zur Änderung der Struktur innerhalb einer am 3'-Ende eines Virus-Genoms befindlichen nicht-translatierten Region (3'-UTR), so daß eine Replikation des Virus-Genoms gehemmt oder blockiert wird.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei ein die 3'-UTR bildender Sequenzabschnitt mittels der dsRNA geschnitten wird.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die 3'-UTR hochkonserviert ist.
17. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang der dsRNA abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR Sequenz ist.
18. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
19. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Strang, vorzugsweise beide

Stränge, am 3'-Ende einen Überhang haben.

21. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet wird.
22. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfaßt. 5
23. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.
24. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus ist.
25. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis-C-Virus ist. 10
26. Medikament zur Hemmung der Replikation von Viren mit einer am 3'-Ende des Virus-Genoms befindlichen nichttranslatierten Region (3'-UTR), dadurch gekennzeichnet, daß ein Mittel zur Änderung der Struktur 3'-UTR enthalten ist.
27. Medikament nach Anspruch 26, wobei das Mittel einen den 3'-UTR bildenden Sequenzabschnitt schneidet. 15
28. Medikament nach Anspruch 26 oder 27, wobei die 3'-UTR hochkonserviert ist.
29. Medikament nach einem der 26 bis 28, wobei das Mittel eine kurze doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) ist.
30. Medikament nach Anspruch 29, wobei der eine Strang der dsRNA abschnittsweise oder vollständig komplementär zur 3'-UTR Sequenz ist. 20
31. Medikament nach einem der Ansprüche 29 bis 34, wobei die dsRNA zumindest abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
32. Medikament nach einem der Ansprüche 29 bis 35, wobei ein Ende der dsRNA, vorzugsweise beide Enden, glatt sind.
33. Medikament nach einem der Ansprüche 29 bis 36, wobei zumindest ein Strang, vorzugsweise beide Stränge, am 3'-Ende einen Überhang haben. 25
34. Medikament nach Anspruch 37, wobei der Überhang aus 1 bis 3 Nukleotiden, vorzugsweise 2 Nukleotiden, gebildet wird.
35. Medikament nach einem der Ansprüche 29 oder 30, wobei der komplementäre Bereich weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare umfaßt. 30
36. Medikament nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die dsRNA eine Länge von weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Basenpaare aufweist.
37. Medikament nach einem der Ansprüche 26 bis 32, wobei das Virus-Genom das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus ist.
38. Medikament nach Anspruch 33, wobei der (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis-C-Virus ist. 35

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

GTC ACC ATG TCG TCA CGG CTA GCT GTG AAA GGT CCA GTC ACC ATG TCG TTT ACT TTG
M S S R L A L K G P V T M S F T L

Fig. 1

GTC ACC TTG TCG TCA CGG CTA GCT GTG AAA GGT CCA GTC ACC ATG TCG TTT ACT TTG
M S F T L

Fig. 2

5' uc GUC ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC ag 3' mRNA p2 & p3
 5' ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU 3' Sinn-Strang (HCV 1)
 3' AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG 5' Antisinn-Strang (HCV 2)

Fig. 3

5' cg GUG AAA UUA UCG AUG AGC GUG gu 3' mRNA
 5' GUG AAA UUA UCG AUG AGC GUG gu 3' Sinn-Strang (Gal 1)
 3' gc CAC UUU AAU AGC UAC UCG CAC 5' Antisinn-Strang (Gal 2)

Fig. 4

5' cc AGA CAG UCG ACU UCA GCC Ugg 3' mRNA
 5' AGA CAG UCG ACU UCA GCC Ugg 3' Sinnstrang (HCV 3)
 3' gg UCU GUC AGC UGA AGU CGG A 5' Antisinn-Strang (HCV 4)

Fig. 5

RNAi-Einfluß auf Plamid p2

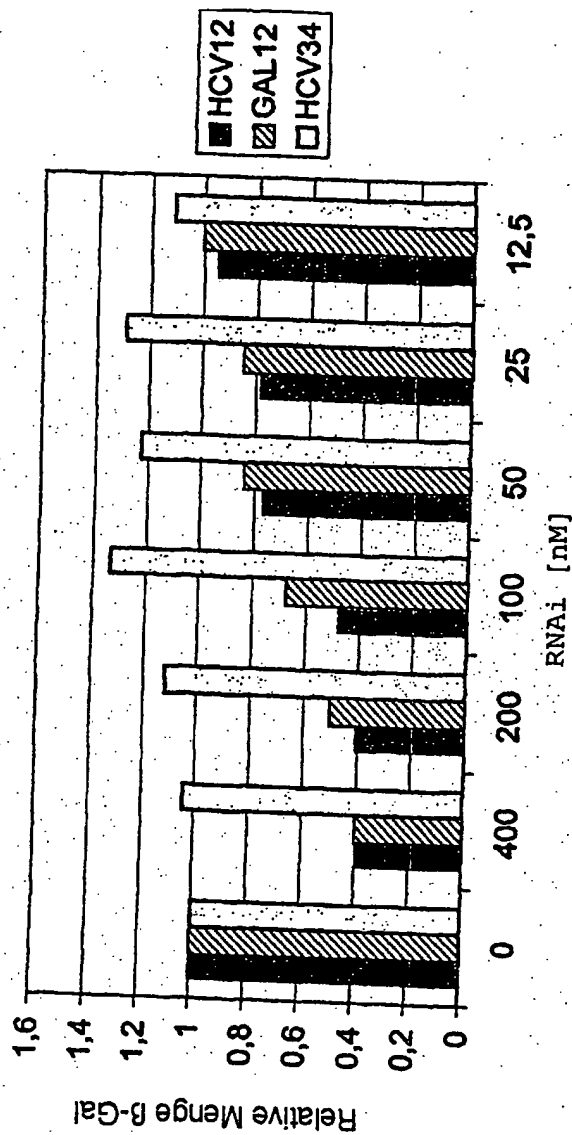


Fig. 6

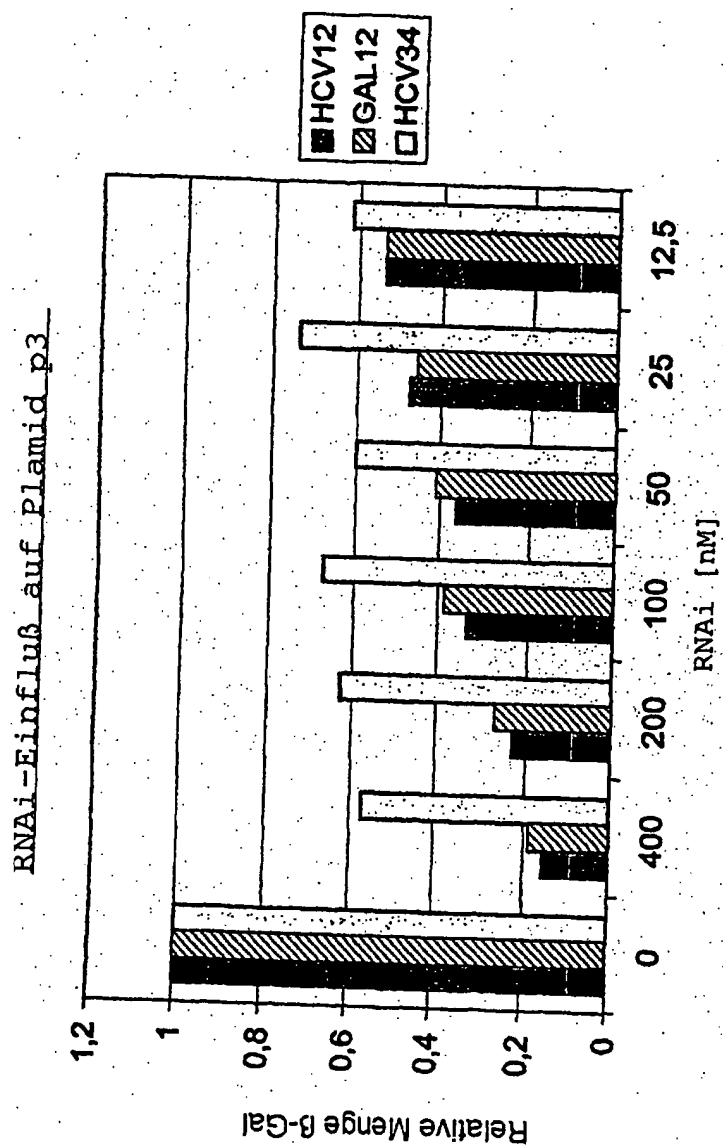


Fig. 7